

**METHOD FOR BREEDING ZENITH LAWN USING AGROBACTERIUM SP.**

**Publication number:** KR20030045388  
**Publication date:** 2003-06-11  
**Inventor:** KIM DOO WHAN (KR); KIM JAE YEOL (KR)  
**Applicant:** KIM DOO WHAN (KR); KONKUK UNIVERSITY (KR)  
**Classification:**  
- international: **A01H4/00; A01H4/00; (IPC1-7): A01H4/00**  
- European:  
**Application number:** KR20010076083 20011204  
**Priority number(s):** KR20010076083 20011204

Report a data error here

**Abstract of KR20030045388**

**PURPOSE:** A method for breeding Zenith lawn using Agrobacterium sp. is provided, thereby cheaply breeding the Zenith lawn having anticipatable character and pesticide resistance within a short period of time. **CONSTITUTION:** A method for breeding Zenith lawn using Agrobacterium sp. comprises the steps of: peeling seeds, followed by sterilization with ethanol and HgCl<sub>2</sub>; culturing the pretreated seeds in a medium selected from MS medium, N6AA medium and NP medium containing 2,4-D to select an embryo developed callus; inserting a plasmid vector containing a bar gene having pesticide resistance and GUS gene into Agrobacterium sp.; co-culturing the embryo developed callus and Agrobacterium sp. containing the plasmid vector harboring the bar gene and the GUS gene in MS medium containing 2,4-D and acetosyringone; transferring the co-cultured embryo developed callus into MS medium containing 2,4-D, BA, Cu, PPT and cefotaxime and selecting a transgenic embryo developed callus; and transferring the transgenic embryo developed callus into a medium for regeneration and regenerating it into a young plant, wherein the Agrobacterium sp. is Agrobacterium tumefaciens strains LBA4404.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. 7  
A01H 4/00

(11) 공개번호 특2003- 0045388  
(43) 공개일자 2003년06월11일

(21) 출원번호 10- 2001- 0076083  
(22) 출원일자 2001년12월04일

(71) 출원인 김두환  
서울 광진구 모진동 93- 1번지

학교법인 건국대학교  
서울특별시 광진구 화양동1

(72) 발명자 김두환  
서울 광진구 모진동 93- 1번지

김재열  
서울특별시광진구모진동202- 3

(74) 대리인 임재룡

심사청구 : 있음

(54) 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디 육종방법

요약

본 발명은 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디 육종방법에 관한 것으로서, 종피를 벗겨내어 에탄올 및 염화수은(Hg Cl<sub>2</sub>)으로 소독하고 증류수로 세정한 난지형 잔디 종자를 이사디(2,4- D)가 포함된 MS 배지, N6AA 배지 및 NP 배지 중 적어도 어느 하나의 배지에서 배양하여 배발생 캘러스를 선발하는 단계; 제초제에 대하여 저항성을 가진 저항성 유전자(bar gene) 와 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터를 아그로박테리움에 삽입하는 단계; 상기 배발생 캘러스 및 상기 제초제에 대하여 저항성을 가진 저항성 유전자(bar gene) 와 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터가 삽입된 아그로박테리움을 이사디(2,4- D)와 아세토시린곤(acetosyringone)이 포함된 MS 배지에서 공동 배양하는 단계; 상기 공동 배양 단계를 거친 상기 배발생 캘러스를 이사디(2,4- D)와, BA와, Cu와, 포스포티트리신(PPT)과, 세포탁심(cefotaxime)이 포함된 MS 배지로 옮긴 후 형질 전환된 배발생 캘러스를 선발하는 단계; 및 형질 전환되어 선발된 상기 배발생 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 유식물체로 재분화시키는 단계; 를 포함한다.

대표도

도 2

색인어

난지형 잔디, 아그로박테리움, 플라스미드, 제초제, 저항성 유전자

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 캘러스와 유식물체 뿌리에서 관찰된 GUS 유전자 발현을 나타내는 사진도.

도 2 는 제초제를 처리한 후 1 주일이 경과된 난지형 잔디를 나타내는 사진도.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디 육종방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 토양 박테리아의 일종인 *Agrobacterium tumefaciens*(이하 '아그로박테리움'이라 한다.)을 이용한 형질전환 기술을 이용하여 제초제에 저항성이 강한 난지형 잔디 육종방법에 관한 것이다.

종래 이용되는 잔디의 육종은 주로 교배육종에 의한 방법이 이용되었다. 이러한 교배육종은 교배를 통해 얻어진 개체들의 특성평가와 선발이라는 과정을 통해 이루어졌다.

그러나, 상기 교배육종은 교배 및 재배 포장면적의 확보에 많은 비용이 소요 되고, 육종기간도 오랜 시간이 소요될 뿐만 아니라 교배를 통해 원하는 형질을 갖는 개체를 확실하게 얻을 수 없거나 기대할 수 없는 문제점이 있었다.

또한, 난지형 잔디는 여러 가지 우수한 특성을 가지고 있으나, 제초제에 대한 내성이 약해 이로 인한 피해가 쉽게 발생한다는 문제점도 있었다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은, 상기 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 난지형 잔디에 아그로박테리움을 이용한 형질전환 기술을 적용하여, 저렴하고 작은 공간 내에서 예측 가능한 형질을 육종할 뿐만 아니라 제초제에도 강한 난지형 잔디를 육종함에 그 목적이 있다.

### 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디 육종방법에 관한 것으로서, 종피를 벗겨내어 에탄올 및 염화수은( $HgCl_2$ )으로 소독하고 증류수로 세정한 난지형 잔디 종자를 이사디(2,4- D)가 포함된 MS 배지, N6AA 배지 및 NP 배지 중 적어도 어느 하나의 배지에서 배양하여 배발생 캘러스를 선발하는 단계; 제초제에 대하여 저항성을 가진 저항성 유전자(bar gene)와 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터를 아그로박테리움에 삽입하는 단계; 상기 배발생 캘러스 및 상기 제초제에 대하여 저항성을 가진 저항성 유전자(bar gene)와 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터가 삽입된 아그로박테리움을 이사디(2,4- D)와 아세토시린곤(acetosyringone)이 포함된 MS 배지에서 공동 배양하는 단계; 상기 공동 배양 단계를 거친 상기 배발생 캘러스를 이사디(2,4- D)와, BA와, Cu와, 포스포트리신(PPT)과, 세포타심(cefotaxime)이 포함된 MS 배지로 옮긴 후 형질 전환된 배발생 캘러스를 선발하는 단계; 및 형질 전환되어 선발된 상기 배발생 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 유식물체로 재분화시키는 단계; 를 포함한다.

바람직하게는 상기 배발생 캘러스 선발 단계는, 상기 이사디(2,4- D)가 2mg/L 또는 4 mg/L 인 것을 특징으로 한다.

또한 바람직하게는 플라스미드 벡터를 아그로박테리움에 삽입하는 단계,

상기 플라스미드 벡터가 pSB- UTPSP 이고, 상기 아그로박테리움이, *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA440 4 인 것을 특징으로 한다.

또한 바람직하게는 상기 형질전환된 캘러스 선발 단계는, 상기 BA 가 2mg/L이고, 상기 Cu 가 100X이고, 상기 포스포트리신(PPT)이 3mg/L인 것을 특징으로 한다.

이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예와 도 1 및 도 2 를 참조하여 상세히 설명하겠다.

참고로, 본 발명자는 동일 자로 특허출원된 발명의 명칭이 '아그로박테리움을 이용한 한지형 벤트그라스 잔디 육종방법' 인 특허출원을 행하였는바, 상기 출원의 명세서 내용은 본 명세서에서 참조되어 진다.

도 1 은 캘러스와 유식물체 뿌리에서 관찰된 GUS 유전자 발현을 나타내는 사진도이고, 도 2 는 제초제를 처리한 후 1 주일이 경과된 난지형 잔디를 나타내는 사진도이다.

#### 단계 1: 배발생 캘러스의 선발.

본 발명에 따른 난지형 잔디를 육종하기 위하여는 우선, 배발생 캘러스를 선발하여야 한다.

본 단계에서는 상기 배발생 캘러스를 선발하기 위하여 한국잔디 품종인 제니스(Zenith)를 이용하였다.

상기 제니스 종자의 종피를 벗겨내어 60% 내지 80%, 바람직하게는 70%의 에탄올과 0.05% 내지 0.15%, 바람직하게는 0.1%의 염화수은( $HgCl_2$ )으로 각각 1분과 20분 동안 소독하고, 증류수로 세정한다.

세정된 상기 제니스 종자를 2mg/L 내지 4 mg/L, 바람직하게는 2mg/L 또는 4 mg/L의 이사디(2,4- D)가 포함된 MS, N6AA 그리고 NP 배지에서 배양하여 배발생 캘러스를 유도하고, 그 중 식물체로 재분화가 가능한 배발생 캘러스를 선발한다.

0.8~ 1%의 비율로 선발되는 상기 배발생 캘러스는 노란색을 띄며 형태적으로 작고 둥근 모양이며 일반 캘러스에 비해 딱딱하고 부서지기 쉬운 특성을 가지고 있다.

#### 단계 2: 저항성 유전자(bar gene)포함한 플라스미드 벡터를 아그로박테리움에 삽입.

상기 배발생 캘러스를 선발한 후, 저항성 유전자(bar gene) 및 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터를 토양 박테리아의 일종인 아그로박테리움에 삽입하는 단계를 수행한다.

본 단계에서 사용되는 상기 저항성 유전자(bar gene)는 바스타(Basta) 및 라운드업(Roundup) 등과 같은 제초제에 대하여 저항성을 가진 유전자이고, 상기 플라스미드 벡터는 pSB- UTPSP 이며 상기 아그로박테리움은 *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 이다.

#### 단계 3: 배발생 캘러스 및 아그로박테리움의 공동 배양

상기 단계 1 에서 선발된 배발생 캘러스 및 상기 단계 2 에서 저항성 유전자(bar gene) 및 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터가 삽입된 아그로박테리움을 공동 배양한다.

본 단계에서는, 현탁 배양중인 상기 저항성 유전자(bar gene) 및 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터가 삽입된 아그로박테리움과 상기 배발생 캘러스를 함께 1mg/L 내지 3mg/L, 바람직하게는 2mg/L의 이사디(2,4- D)와 일반적인 농도(100  $\mu$  M)의 아세토시링곤(acetosyringone)이 포함된 MS 배지에서 3 일간 20°C 내지 30°C, 바람직하게는 25 °C의 암실에서 공동 배양하여 배양과정동안 상기 아그로박테리움에 삽입된 상기 저항성 유전자(bar gene)가 상기 배발생 캘러스에 삽입되도록 하였다.

#### 단계 4: 형질전환 배발생 캘러스의 선발.

상기 단계 3 의 공동 배양 단계를 거친 상기 배발생 캘러스를 1mg/L 내지 3mg/L 바람직하게는 2mg/L의 이사디(2,4- D)와, 1mg/L 내지 3mg/L 바람직하게는 0.2mg/L의 BA와, 100X의 Cu와, 1mg/L 내지 5mg/L 바람직하게는 3mg/L의 포스포트리신(phosphinothricin, 이하 'PPT' 라 한다.)과, 일반적인 농도(250mg/L)의 세프트락심(cefotaxime)이 포함된 MS 배지로 옮긴 후 형질 전환된 캘러스를 선발한다.

상기 PPT는 기내에서의 형질 전환체를 선발하기 위해 첨가하는 것으로서, 제초제 저항성 유전자가 삽입된 형질전환 식물체는 PPT가 포함된 배지에서 일반적인 생육을 나타내지만, 제초제 저항성 유전자가 삽입되지 않은 비 형질전환 식물체는 상기 PPT가 포함된 배지에서 정상적인 생육이 불가능하다.

#### 단계 5: 식물체 재분화.

상기 단계 4 에서 선발된 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 유식물체로 재분화 시킨다.

#### 단계 6: 형질전환의 검정.

상기 재분화된 유식물체의 형질전환 여부를 검정하기 위하여 상기 단계 2 에서 삽입된 GUS 유전자가 confocal laser scanning microscope(CLSM)에 의하여 상기 도 1 에 예시된 바와 같이 상기 재분화된 유식물체의 뿌리에서 발견되는지 여부를 확인한다.

단계 7: 제초제 저항성 테스트.

본 발명에 따른 난지형 잔디를 육종하기 위한 마지막 단계로서, 상기 재분화된 유식물체에 제초제 저항성 테스트를 수행한다.

본 단계에서 상기 제초제 저항성 테스트는 다음과 같이 수행된다.

상기 재분화된 유식물체를 기내에서 온실의 화분에 옮겨 심은 후, 비선택성 제초제인 배스타(Basta)를 사용 권장농도인 0.3% 보다 높은 0.5% 농도로 잎에 스프레이 처리한 후 1주일 뒤에 제초제 반응을 살펴본다.

형질 전환된 상기 유식물체는 상기 도 2 에 예시된 바와 같이 배스타(Basta) 에 대한 강한 저항성을 보였는 바, 초기에는 상기 제초제에 반응하여 엷색이 갈색으로 조금 변화하였으나 곧 정상으로 회복되었고, 대부분의 식물체는 제초제 처리 후에도 생리적으로 변화하지 않고 정상적으로 생육하였다.

위와 같은 실험결과를 바탕으로 본 실험에서 얻어진 제초제 저항성 난지형 잔디는 성공적인 형질전환 식물체임이 판명되었음을 알 수 있다.

이상에서 설명한 본 발명은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하므로 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되는 것이 아니다.

#### 발명의 효과

상기와 같은 본 발명에 따르면, 저렴하고 짧은 시간 내에 예측 가능한 형질을 가진 제초제에 강한 난지형 잔디를 육종할 수 있는 효과가 있다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

난지형 잔디 육종방법에 있어서,

종피를 벗겨내어 에탄올 및 염화수은( $\text{HgCl}_2$ )으로 소독하고 증류수로 세정한 난지형 잔디 종자를 이사디(2,4- D)가 포함된 MS 배지, N6AA 배지 및 NP 배지 중 적어도 어느 하나의 배지에서 배양하여 배발생 캘러스를 선발하는 단계;

제초제에 대하여 저항성을 가진 저항성 유전자(bar gene) 와 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터를 아그로박테리움에 삽입하는 단계;

상기 배발생 캘러스 및 상기 제초제에 대하여 저항성을 가진 저항성 유전자(bar gene) 와 GUS 유전자를 포함한 플라스미드 벡터가 삽입된 아그로박테리움을 이사디(2,4- D)와 아세토시린곤(acetosyringone)이 포함된 MS 배지에서 공동 배양하는 단계;

상기 공동 배양 단계를 거친 상기 배발생 캘러스를 이사디(2,4- D)와, BA와, Cu와, 포스포토트리신(PPT)과, 세프트락심(cefotaxime)이 포함된 MS 배지로 옮긴 후 형질 전환된 배발생 캘러스를 선발하는 단계; 및

형질 전환되어 선발된 상기 배발생 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 유식물체로 재분화시키는 단계; 를 포함하는 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디 육종방법.

##### 청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 배발생 캘러스 선발 단계는,

상기 이사디(2,4- D)가 2mg/L 또는 4 mg/L 인 것을 특징으로 하는 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디 육종방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서,

플라즈미드 벡터를 아그로박테리움에 삽입하는 단계,

상기 플라즈미드 벡터가 pSB- UTPSP 이고,

상기 아그로박테리움이, *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 인 것을 특징으로 하는 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디 육종방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서,

상기 형질전환된 캘러스 선발 단계는,

상기 BA 가 2mg/L이고,

상기 Cu 가 100X이고,

상기 포스포트리신(PPT)이 3mg/L인 것을 특징으로 하는 아그로박테리움을 이용한 난지형 잔디.

도면

도면1



도면2

